

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-195891

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 7/64  
C 11 C 3/10  
//C 12 P 7/64  
C 12 R 1:72

識別記号

庁内整理番号

6926-4B  
7106-4H

⑬ 公開 平成2年(1990)8月2日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 油脂の改質方法

⑯ 特 願 平1-14030

⑰ 出 願 平1(1989)1月25日

⑱ 発 明 者 中 田 正 秀 茨城県つくば市梅園2丁目24番5号  
⑲ 発 明 者 船 田 正 茨城県つくば市梅園2丁目24番5号  
⑳ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号  
㉑ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

油脂の改質方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) リパーゼを触媒として油脂を改質する際に、キャンディグシリンドラセ(*Candida cylindracea*)の生産するリパーゼを用いて反応系のpHを7.5 から9.0 の範囲に保ってグリセリドのSn-2位のアシル基を特異的に変換して融点が32から39℃の油脂を得ることを特徴とする油脂の改質方法。

(2) リパーゼを触媒として油脂を改質する際に、キャンディグシリンドラセ(*Candida cylindracea*)の生産するリパーゼを用いて反応系のpHを3.5 から6.5 の範囲に保ってグリセリドのSn-1及び3位のアシル基を特異的に変換して融点が32から39℃の油脂を得ることを特徴とする油脂の改質方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、キャンディグシリンドラセ(*Candida cylindracea*)の生産するリパーゼのエステル交換能及びエステル合成能を利用して、牛脂、豚脂、オリーブ油、パーム油、大豆油の脂肪酸組成を換え、その物理的・化学的性質を改変することにより、カカオ脂類似の油脂を得るための改質方法に関する。

(従来技術)

従来チョコレートにはカカオから取れるカカオ脂が用いられている。このカカオ脂は融点が32から39℃と狭い範囲にあり、口に入れた時に体温でゆるやかに溶解するという物性を示し、まろやかさをもたせるので、チョコレートには欠かせない素材となっている。このカカオ脂は成分の70%が1-パルミチル、2-オレイル、3-ステアシルグリセロールであり、カカオ脂に特徴的な物性はこのグリセリド構造に起因していると考えられている。現在生産されているチョコレートにはおよそ30重量%のカカオ脂が含まれている。

リパーゼを用いて油脂を改質して、カカオ脂類

似物を得る方法は従来から知られている（特開昭52-104506、特開昭55-84397）

（発明が解決しようとする課題）

しかしながらこのカカオ脂は世界的に見れば、ほとんどが熱帯地方で生産されているのでその生産量が安定的ではなく、価格変動が大きいという課題があった。従って食品工業界では同様の物性を示す代替油脂が求められていた。

前記の改質方法は、反応系のpHによるリパーゼの反応のS<sub>n</sub>位置特異性を全く無視していたので、反応効率が悪く長時間を要し、また得られた油脂の物性も十分満足できるものではなかった。

（課題を解決するための手段）

本発明は、リパーゼを触媒として油脂を改質する際に、キャンディグシリンドラセ (*Candida cylindracea*) の生産するリパーゼを用いて反応系のpHを7.5 から9.0 の範囲に保ってグリセリドのS<sub>n</sub>-2位のアシル基を特異的に変換して融点が32から39度の油脂を得ることを特徴とする油脂の改質方法であり、また、リパーゼを触媒として油

脂を改質する際に、キャンディグシリンドラセの生産するリパーゼを用いて反応系のpHを3.5 から6.5 の範囲に保ってグリセリドのS<sub>n</sub>-1及び3位のアシル基を特異的に変換して融点が32から39度の油脂を得ることを特徴とする油脂の改質方法である。

本発明者らは、キャンディグシリンドラセリパーゼの応用について研究を行っており、その一端としてこの酵素を精製したところ、S<sub>n</sub>-1、3位を選択的に加水分解する酵素（リパーゼA）と2位のみを選択的に加水分解する酵素（リパーゼB）の2種が含まれていること、この2種の酵素がそれぞれ最適pHが4.5(A)は8.0(B)であり、活性発現領域が3.5 から6.5(A)および7.50から9(B)と異なっていることを見出し、本発明をなすに至った。すなわち油脂の改質方法である。

本発明で用いられるキャンディグシリンドラセリパーゼはすでに市販されているもので、名糖産業㈱のリパーゼOFである。この酵素は、キャンディグシリンドラセの培養濾液をアセトン処理し

て生じた沈澱を乾燥したものである。この酵素は反応させる油脂1gあたり1から10mgを用いる。また、この酵素は緩衝液に溶解させただけの溶液状で用いてもよいし、イオン交換樹脂、無機材料、高分子ゲルなどに固定化した物を用いてもよい。

前述の通り、リパーゼAは酸性領域で活性を発現し、中性以上ではほとんど活性を示さず、対照的にリパーゼBはアルカリ性で活性を発現し、酸性側ではほとんど活性がない。従って粗酵素を用いても反応系のpHを調整してやれば位置特異的な反応が可能になる。すなわち酸性側では1、3位のみが、アルカリ側では2位のみが反応するのである。

この酵素の位置特異的な反応性とpH依存性を利用し、牛脂、豚脂、パーム油等の固体脂のS<sub>n</sub>-2位にオレイン酸をまたオリーブ油、大豆油等の液体脂のS<sub>n</sub>-1、3位にステアリン酸、またはパルミチン酸を導入することにより、32から39度の間の狭い範囲にその融点を示す油脂に改質する方法に関する。

本発明で用いられる油脂としては例えば固体脂として、牛脂、豚脂、パーム油等があり、液体脂としてオリーブ油、大豆油、コーン油、サフラワー油等を上げることができる。また、エステル交換する脂肪酸源としてはステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸等がある。これらの油脂および脂肪酸としては食品工業用に市販されている物であれば特にその起源を限定する必要はない。

反応は酵素の活性が効率的に発揮される20℃から50℃の範囲で行われ、好ましくは30から40℃の範囲内で行われる。

この反応系はpHが変化しないように緩衝液系で行われる。緩衝液はこれまで知られている物であればどのようなものでもよいが、設定するpH領域に適したものを選択する必要がある。例えばpHが3.5 から6.5 の範囲内ではグリシン-塩酸緩衝液、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、クエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液など、pHが7から8.5 の範囲内では、リン酸ナトリウム緩衝液、トリス-塩酸緩衝液等が上げられる。

反応時間は1から24時間の範囲内であり、好ましくは3から10時間の範囲内である。

この反応は疎水性の油脂、脂肪酸などと酵素水溶液または固定化酵素の二層系で行われるので、効果的な攪拌が必要である。通常100 から500rpmの範囲内で十分な攪拌が得られる。また不飽和脂肪酸の酸化を防ぐために窒素をバブリングしながら反応を行う。

エステル交換反応、エステル合成反応ともにその反応速度、反応率にとり、水の含有率が極めて重要である。すなわち水の含量が高すぎるとリパーゼによる加水分解の方向に平衡が傾き、グリセリドが分解されてしまうことになるからである。通常この水の含量は油脂に対して0.01から20重量%であり、好ましくは0.1 から10%の範囲内で行われる。

#### (発明の効果)

本発明の方法はキャンディグシリンドラセ由来のリパーゼを用いてそのpHによる反応のS<sub>N</sub>-位置特異性を利用したので、安価な原料油脂からカ

オ脂と同等の物性を示す融点32~39℃の良質の改質油脂が効率良く安定的に供給でき、工業的に遊離な素材を提供することができる。

#### (実施例)

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

#### 実施例 1

500 ml容四つ口フラスコに牛脂（和光純薬製品、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸の含量は各々36%、25%、30%、融点は35から50℃）100g、オレイン酸20g（日本油脂製品、純度99%）とリパーゼOF（名糖産業製品）1gを溶解させた0.1Mのトリスー塩酸緩衝液、pH8.0を5ml加え、窒素バブリングしながら、200rpmで攪拌しつつ、40℃で反応させた。10時間で反応を止め、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりトリグリセリド区分を精製した。このトリグリセリドのオレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸含量は各々55%、18%、20%であった。また融点は36±1℃、収率は約85%であった。

#### 実施例 2

実施例1において牛脂を豚脂（和光純薬製品、融点28から48℃、オレイン酸42%、ステアリン酸15%、パルミチン酸28%）に、オレイン酸をオリーブ油に、緩衝液のpHを8.5に代えた以外は同様に行った。得られたトリグリセリドの収率は約87%、脂肪酸組成は、オレイン酸59%、ステアリン酸19%、パルミチン酸25%、融点は34±1℃であった。

#### 実施例 3

実施例1において牛脂をオリーブ油（和光純薬製品、融点0から6℃、オレイン酸76%、ステアリン酸2%、パルミチン酸12%）に、オレイン酸をステアリン酸10g、パルミチン酸10g（ともに日本油脂製品、純度96%）に代え、トリスー塩酸緩衝液を0.1Mの酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5に代えた以外は同様に行った。得られたトリグリセリドはオレイン酸55%、ステアリン酸19%、パルミチン酸22%含み、融点が37±1℃であり、収率は約88%であった。

#### 実施例 4

実施例1においてリパーゼOFをイオン交換樹脂（アンバーリスト15、オルガノ特製品）にイオン吸着させたもの10g（1gの酵素を含む）に代えた以外は同様に行った。得られたトリグリセリドはオレイン酸51%、ステアリン酸22%、パルミチン酸25%含み、融点が38±1℃であり、収率は約90%であった。

#### 実施例 5

実施例1において牛脂を大豆油（和光純薬製品、オレイン酸25%、ステアリン酸4%、パルミチン酸14%、融点は7から8℃）に、オレイン酸をステアリン酸10g、パルミチン酸10gに、トリスー塩酸緩衝液を0.1Mの酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に代えた以外は同様に行った。得られたトリグリセリドはオレイン酸50%、ステアリン酸21%、パルミチン酸23%含み、融点が35±1℃であり、収率は約90%であった。

#### 実施例 6

実施例1において牛脂をパーム油に（和光純薬

製品、オレイン酸41.5%、パルミチン酸45.5%、ステアリン酸4.5%、融点は27から50℃)、オレイン酸をオリーブ油に、緩衝液のpHを8.0から7.5に代えた以外は同様にして行った。得られたトリグリセリドは融点が $36 \pm 1$ ℃であり、オレイン酸51%、ステアリン酸15%、パルミチン酸28%を含んでいた。

#### 比較例 1

実施例 1 においてトリス-塩酸緩衝液を0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0にかえた以外は同様にして行った。得られたトリグリセリドにはオレイン酸55%、ステアリン酸19%、パルミチン酸22%が含まれており、実施例 1 と脂肪酸組成では類似したものが得られたが、融点は $27 \pm 1$ ℃であり、目的の油脂は得られなかった。これはpH 6で最大活性を示す1, 3位に作用するリパーゼの働きによりSn-1位または3位にオレイン酸が導入されたために融点が大幅に減少したものと考えられた。従って実施例 1 のトリグリセリドとは脂肪酸組成が同じで構造が全く異なるものであ

ると考えられた。

#### 比較例 2

実施例 3 において酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を0.1Mトリス-塩酸緩衝液、pH7.5にかえた以外は同様に行った。得られたトリグリセリドはオレイン酸51%、ステアリン酸22%、パルミチン酸を23%含んでいたが、融点は $42 \pm 1$ ℃であり、目的の油脂は得られなかった。これはpH7.5でSn-2位に作用するリパーゼが作用し、ステアリン酸とパルミチン酸がこの2位に導入されたため、脂肪酸組成は実施例 3 と同程度であるのに融点が異なるという結果になったものと考えられた。

特許出願人 日本油脂株式会社  
代理人 弁理士 舟橋 榮子



Reference No. 5

JP H02-195891 A

1. Title of the Invention

Method for Modification of Fats or Oils

2. Claims

(1) A method for lipase-catalyzed modification of a fat or oil, which comprises specifically converting the acyl group at the Sn-2 position of a glyceride by using a lipase produced by *Candida cylindracea* and while maintaining the reaction system within the pH range of 7.5 to 9.0 to thereby obtain a fat or oil having a melting point of 32°C to 39°C.

(2) A method for lipase-catalyzed modification of a fat or oil, which comprises specifically converting the acyl groups at the Sn-1 and Sn-3 positions of a glyceride by using a lipase produced by *Candida cylindracea* and while maintaining the reaction system within the pH range of 3.5 to 6.5 to thereby obtain a fat or oil having a melting point of 32°C to 39°C.

3. Detailed Description of the Invention

(Field of Industrial Application)

The present invention relates to a method for obtaining a modified fat or oil resembling cacao butter, which relies on the transesterification and esterification abilities of a lipase produced by *Candida cylindracea* and is intended to alter the fatty acid rate of beef tallow, lard, olive oil, palm oil or soybean oil to thereby modify its physical and chemical properties.

(Prior Art)

Conventionally, cacao butter extracted from cacao beans

is used in chocolate. This cacao butter has a melting point in the narrow range of 32°C to 39°C and slowly melts at body temperature when taken into the mouth. Due to this property resulting in smoothness, cacao butter is an essential material for chocolate. In this cacao butter, 70% of the ingredients is 1-palmityl-2-oleyl-3-stearyl glycerol, and properties characteristic of cacao butter would be ascribed to this glyceride structure. Currently produced chocolate contains about 30% by weight of cacao butter.

It is conventionally known to obtain cacao butter-like products by modifying fats or oils with lipase (JP S52-104506 A, JP S55-84397 A).

#### (Problems to be Solved by the Invention)

However, this cacao butter is produced almost exclusively in tropical regions, and hence involves problems of unstable yield and large fluctuations in price. Thus, in the food industry, there has been a demand for alternative fats or oils having the same properties as cacao butter.

The above conventional modification techniques provide low reaction efficiency and require a long time for reaction, because they completely neglect the Sn-position specificity of lipase reaction, which varies depending on the pH of the reaction system. Moreover, properties of the resulting fats or oils are also not fully satisfactory.

#### (Means for Solving the Problems)

The present invention provides a method for lipase-catalyzed modification of a fat or oil, which comprises specifically converting the acyl group at the Sn-2 position of a glyceride by using a lipase produced by *Candida cylindracea* and while maintaining the reaction system within the pH range

of 7.5 to 9.0 to thereby obtain a fat or oil having a melting point of 32°C to 39°C. The present invention also provides a method for lipase-catalyzed modification of a fat or oil, which comprises specifically converting the acyl groups at the Sn-1 and Sn-3 positions of a glyceride by using a lipase produced by *Candida cylindracea* and while maintaining the reaction system within the pH range of 3.5 to 6.5 to thereby obtain a fat or oil having a melting point of 32°C to 39°C.

The inventors of the present invention have made studies on applications of *Candida cylindracea* lipase and have purified this enzyme during these studies, thereby finding that there are two types of members, i.e., an enzyme selectively hydrolyzing both the Sn-1 and Sn-3 positions (lipase A) and an enzyme selectively hydrolyzing only the Sn-2 position (lipase B). The inventors have also found that these two enzymes have an optimal pH of 4.5 (lipase A) and 8.0 (lipase B), respectively, and they exert their activity in different pH ranges of 3.5 to 6.5 (lipase A) and 7.50 to 9 (lipase B). These findings led to the completion of the present invention, i.e., a method for modification of a fat or oil.

*Candida cylindracea* lipase used in the present invention is already commercially available under the trade name "Lipase OF" from Meito Sangyo Co., Ltd. This enzyme is obtained from the filtrate of a *Candida cylindracea* culture by treatment with acetone and drying the resulting precipitate. This enzyme is used in an amount of 1 to 10 mg per gram of a target fat or oil to be reacted. This enzyme may be used in the form of a solution which is simply dissolved in a buffer, or may be immobilized on a support such as an ion exchange resin, an inorganic material or a polymer gel.

As described above, lipase A exerts its activity in an acidic pH range and shows little activity at neutral or higher

pH. In contrast, lipase B exerts its activity at alkaline pH and shows little activity at acidic pH. Thus, even a crude enzyme can be used to effect a position-specific reaction when the pH of the reaction system is adjusted. Namely, acidic pH ensures the reaction exclusively at the Sn-1 and Sn-3 positions, while alkaline pH ensures the reaction exclusively at the Sn-2 position.

The present invention relates to a method based on the position-specific reactivity and pH dependence of this enzyme, by which oleic acid is introduced at the Sn-2 position of a solid fat (e.g., beef tallow, lard, palm oil) or stearic acid or palmitic acid is introduced at the Sn-1 and Sn-3 positions of a liquid oil (e.g., olive oil, soybean oil) to obtain a modified fat or oil whose melting point is in the narrow range of 32°C to 39°C.

Examples of fats or oils used in the present invention include solid fats such as beef tallow, lard and palm oil, as well as liquid oils such as olive oil, soybean oil, corn oil and safflower oil. Fatty acid sources for transesterification include stearic acid, palmitic acid, oleic acid and so on. These fats or oils and fatty acids may be of any origin as long as they are commercially available for food industry purposes.

The reaction is carried out in the range of 20°C to 50°C where the enzyme efficiently exerts its activity, with the range of 30°C to 40°C being preferred.

To avoid pH changes in the reaction system, this reaction is carried out in a buffer system. Although any conventionally known buffer may be used, it is necessary to select a buffer suitable for the intended pH range. Examples include glycine-HCl buffer, acetic acid-sodium acetate buffer, citric acid-disodium phosphate buffer and sodium phosphate buffer for the pH range of 3.5 to 6.5, as well as sodium phosphate buffer



and Tris-HCl buffer for the pH range of 7 to 8.5.

The reaction time ranges from 1 to 24 hours, preferably 3 to 10 hours.

Since this reaction is accomplished in a two-phase system composed of hydrophobic elements (e.g., fat or oil, fatty acid) and an enzyme solution or an immobilized enzyme, it is necessary to effectively stir the reaction system. In general, stirring at 100 to 500 rpm is sufficient. Moreover, to avoid oxidation of unsaturated fatty acids, the reaction is carried out while bubbling nitrogen.

In both transesterification and esterification, the water content is very important for the reaction velocity and reaction rate. This is because too high a water content will shift the equilibrium towards hydrolysis with lipase to cause glyceride degradation. The water content generally ranges from 0.01% to 20% by weight, preferably 0.1% to 10% by weight of the fat or oil.

#### (Advantages of the Invention)

The method of the present invention uses a lipase derived from *Candida cylindracea* and is based on its Sn-position specificity, which varies depending on the reaction pH. Thus, the method of the present invention enables efficient and stable supply of modified fats or oils of good quality showing the same properties as cacao butter and having a melting point of 32°C to 39°C, starting from inexpensive fats or oils, and it also enables the provision of industrially advantageous materials.

#### (Examples)

The present invention will be described in more detail by way of the following examples.

##### Example 1

A 500 ml four-necked flask was charged with 10 g beef tallow (a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., containing 36% oleic acid, 25% stearic acid and 30% palmitic acid and having a melting point of 35-50°C), 20 g oleic acid (a product of NOF Corporation, purity: 99%) and 1 g lipase OF (a product of Meito Sangyo Co., Ltd.) which had been dissolved in 5 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), followed by reaction at 40°C while stirring at 200 rpm under nitrogen bubbling. The reaction was stopped after 10 hours and the reaction product was purified by silica gel column chromatography to isolate a triglyceride fraction. This triglyceride fraction contained 55% oleic acid, 18% stearic acid and 20% palmitic acid, and had a melting point of  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  and a yield of about 85%.

#### Example 2

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that beef tallow was replaced by lard (a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., having a melting point of 28-48°C and containing 42% oleic acid, 15% stearic acid and 28% palmitic acid), oleic acid was replaced by olive oil, and the buffer pH was set to 8.5. The resulting triglyceride had a yield of about 87%, contained 59% oleic acid, 19% stearic acid and 25% palmitic acid, and had a melting point of  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### Example 3

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that beef tallow was replaced by olive oil (a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., having a melting point of 0-6°C and containing 76% oleic acid, 2% stearic acid and 12% palmitic acid), oleic acid was replaced by stearic acid (10 g) and palmitic acid (10 g) (both are products of NOF Corporation, purity: 99%), and Tris-HCl buffer was replaced by 0.1 M acetic

acid-sodium acetate buffer (pH 4.5). The resulting triglyceride contained 55% oleic acid, 19% stearic acid and 22% palmitic acid, and had a melting point of  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and a yield of about 88%.

#### Example 4

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that lipase OF was immobilized on an ion exchange resin (Amberlist 15, Organo) by ionic adsorption (10 g total weight, containing 1 g enzyme). The resulting triglyceride contained 51% oleic acid, 22% stearic acid and 25% palmitic acid, and had a melting point of  $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and a yield of about 90%.

#### Example 5

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that beef tallow was replaced by soybean oil (a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., containing 25% oleic acid, 4% stearic acid and 14% palmitic acid and having a melting point of  $7-8^{\circ}\text{C}$ ), oleic acid was replaced by stearic acid (10 g) and palmitic acid (10 g), and Tris-HCl buffer was replaced by 0.1 M acetic acid-sodium acetate buffer (pH 5.0). The resulting triglyceride contained 50% oleic acid, 21% stearic acid and 23% palmitic acid, and had a melting point of  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and a yield of about 90%.

#### Example 6

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that beef tallow was replaced by palm oil (a product of Wako Pure Chemical Industries, Ltd., containing 41.5% oleic acid, 45.5% palmitic acid and 4.5% stearic acid and having a melting point of  $27-50^{\circ}\text{C}$ ), oleic acid was replaced by olive oil, and the buffer pH was changed from 8.0 to 7.5. The resulting

triglyceride had a melting point of  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and contained 51% oleic acid, 15% stearic acid and 28% palmitic acid.

#### Comparative Example 1

The same procedure as shown in Example 1 was repeated, except that Tris-HCl buffer was replaced by 0.1 M acetic acid-sodium acetate buffer (pH 6.0). The resulting triglyceride contained 55% oleic acid, 19% stearic acid and 22% palmitic acid. The fatty acid rate of this triglyceride was similar to that obtained in Example 1, but this triglyceride had a melting point of  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Thus, no desired fat or oil was obtained. This would be because the melting point was greatly reduced due to oleic acid introduced at the Sn-1 or Sn-3 position by the action of lipase on the Sn-1 and Sn-3 positions, which reaches a maximum at pH 6. The triglyceride thus obtained was therefore structurally completely different from the triglyceride obtained in Example 1 even when they had the same fatty acid rate.

#### Comparative Example 2

The same procedure as shown in Example 3 was repeated, except that acetic acid-sodium acetate buffer was replaced by 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5). The resulting triglyceride contained 51% oleic acid, 22% stearic acid and 23% palmitic acid, but it had a melting point of  $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Thus, no desired fat or oil was obtained. This would be because stearic acid and palmitic acid were introduced at the Sn-2 position by the action of lipase on the Sn-2 position at pH 7.5. As a result, the triglyceride thus obtained showed a different melting point even at the same fatty acid rate as in Example 3.